

... ФІЗІОЛОГІЯ ЛЮДИНИ ТА ТВАРИН ...

УДК: 615.361.37:616.379–008.64–092.4

Трансплантация островков поджелудочной железы новорожденных поросят в костный мозг кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа

Н.В.Колот¹, Г.А.Божок², Є.І.Легач², Т.П.Бондаренко¹

¹Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

²Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

Исследовали показатели углеводного обмена после ксенотрансплантации островков поджелудочной железы в костный мозг кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа. Трансплантация в костный мозг панкреатических островков новорожденных поросят в течение 60 суток позволяет поддерживать нормогликемию и регулировать углеводный обмен в организме животных-реципиентов.

Ключевые слова: *островки поджелудочной железы, трансплантация, углеводный обмен, сахарный диабет 1 типа.*

Введение

Островки Лангерганса представляют собой совокупность клеток, которые являются функциональной эндокринной единицей поджелудочной железы. Одной из важных функций островков поджелудочной железы (ОПЖ) является регуляция углеводного обмена в организме человека и всех позвоночных животных (Basta et al., 2004; Valdes-Gonzalez et al., 2005). Частичная или полная деструкция инсулинпродуцирующих β -клеток ОПЖ, вызванная экзогенными или эндогенными факторами среды, приводит к отсутствию в организме инсулина и как следствие способствует развитию тяжелого соматического заболевания – сахарного диабета 1 типа (СД 1 типа) (Дедов и др., 2001; Ельський та ін., 2007; Qixin et al., 2004). На сегодняшний день основным способом коррекции гипергликемии является постоянное введение экзогенного инсулина больным СД 1 типа. Однако длительное использование инсулина или других гипогликемических препаратов может привести к инсулинорезистентности, а также не предотвращает развитие макро- и микроваскулярных диабетических осложнений (Дедов и др., 2001; Ковальська, 2000; Комісаренко та ін., 2003; King et al., 2003). Трансплантация ОПЖ является перспективным направлением в лечении сахарного диабета, так как позволяет создать в организме реципиента эндогенное «депо» полноценных гормонов, которые способны поддерживать на физиологическом уровне адекватную регуляцию обменных процессов в организме, и может быть альтернативой инсулинотерапии (Анастасій та ін., 2000; Ельський та ін., 2007; Турчин та ін., 2002; Ryan et al., 2002; Vizzardelli et al., 2002).

В настоящее время начал широко внедряться в клиническую практику Эдмонтонский протокол, согласно которому трансплантация человеческих островков, выделенных из поджелудочной железы двух и более доноров, приводит на длительное время к инсулинонезависимости, препятствует развитию вторичных осложнений диабета (King et al., 2003; Qixin et al., 2004). Однако ряд проблем, связанных с дефицитом донорского материала, а также этические и юридические вопросы ограничивают широкое использование человеческих ОПЖ для трансплантации (Третьяк и др., 2004; King et al., 2003; Triverdi et al., 2001). Использование в качестве доноров для трансплантации ОПЖ новорожденных поросят может решить эту проблему. Преимущество этого способа в том, что количество трансплантационного материала практически не ограничено, к тому же существует идентичность химической и молекулярной структуры, антигенных особенностей инсулина человека и свиньи (Турчин та ін., 2002; Basta et al., 2004; Valdes-Gonzalez et al., 2005; Vizzardelli et al., 2002). Основной проблемой трансплантации является развитие иммунологического отторжения в организме реципиента, которое приводит к быстрой потери трансплантата. Использование иммуносупрессивных препаратов в случае трансплантации ОПЖ является неэффективным, так как кортикостероидные препараты обладают диабетогенным свойством, а циклоспорин А, такролимус токсичны для панкреатических островков (Delis et al., 2006; Sato et al., 2003).

Известно, что трансплантация в иммунопривилегированные сайты организма (тестисы, передняя камера глаза) снижает развитие отторжения и увеличивает сроки функционирования трансплантата без использования иммуносупрессантов (Simpson, 2006). Имеются также данные о том, что аллотрансплантация ОПЖ в костный мозг реципиента приводит к быстрой стабилизации углеводного обмена, длительной нормогликемии без использования экзогенного инсулина, а также

улучшает состояние больных СД 1 типа (Delis et al., 2006; Horton et al., 2000; Salazar-Banuelos et al., 2008).

Цель работы – оценить влияние ксенотрансплантации островков поджелудочной железы в костный мозг на уровень гликемии и другие показатели углеводного обмена у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа.

Объекты и методы исследования

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, которые используются с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1985) и национальными нормами по биоэтике (I Национальный конгресс по биоэтике, Киев, 2001).

Исследования проводили на 4–5-месячных самцах кроликов, массой 2,5–3,5 кг. Сахарный диабет вызвали однократным введением в ушную вену раствора аллоксана тетрагидрата из расчета 100 мг/кг массы тела животного. Раствор аллоксана готовили непосредственно перед введением путем разведения кристаллического субстрата Alloxan Tetrahydrate (фирмы Sigma, США) в стерильном физиологическом растворе.

Культуры островков поджелудочной железы новорожденных поросят получали по методу (Korbitt et al., 1996). Эндокринную часть поджелудочной железы измельчали на фрагменты в растворе Hank's, содержащем 0,25% BSA, 10 мМ Hepes и антибиотики, отмывали 3–4 раза и инкубировали в течение 15 минут при 37°C в растворе, содержащем 1,1 мг/мл коллагеназы, отмывали 2 раза раствором Hank's, содержащем 0,25% BSA, 10 мМ Hepes и антибиотики, и протирали через нейлоновую сетку с диаметром ячеек >200 мкм в стерильную культуральную чашку, добавляя 2 мл среды 199 с антибиотиками.

Перед трансплантацией животные были разделены на 3 группы: 1 группа (n=5) – интактные животные; 2 группа (n=5) – животные с экспериментальным СД 1 типа. Животным 1 и 2 групп вместо трансплантата вводили в костный мозг левой бедренной кости по 2 мл питательной среды 199 с антибиотиками; 3 группа (n=6) – животные с экспериментальным СД 1 типа, которым в костный мозг вводили ксеногенные ОПЖ. Доза трансплантационного материала в среднем составляла $7-9 \times 10^6$ островков/кг. Уровень глюкозы в крови животных с экспериментальным СД 1 типа перед трансплантацией был 24–26 ммоль/л. Трансплантацию островков, полученных от новорожденных поросят, проводили на 21 сутки после введения раствора аллоксана, кроликам под комбинированным наркозом (1 мг кетамина и 0,5 мг ксилазина на 1 кг массы тела). Контролем (n=5) были интактные животные.

Еженедельно контролировали уровень глюкозы в крови экспериментальных животных при помощи индикаторных пластинок «Гемоглан» на глюкометре Глюкофот–II. Срок наблюдения составлял 91 день.

Тест на толерантность к глюкозе проводили на 90 сутки после ксенотрансплантации путем однократного введения в ушную вену глюкозы (0,5 г/кг). Измерения проводили перед введением и на 15, 30, 45, 60, 75, 90 минуте после введения глюкозы.

Содержание гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} определяли на 90 сутки после трансплантации фотометрическим методом при помощи стандартных наборов GHB 100 и HB 400 S (Lachema, Чехия).

Содержание глюкозы в моче определяли каждую неделю после трансплантации ОПЖ экспресс-методом с помощью индикаторных полосок «Глюкотест».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программного приложения Excel. Данные представлены как среднее значений, полученных в трех аналогичных экспериментах и измеренных в двух параллельных пробах, и стандартная ошибка. Статистическую достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа, достоверными считались различия при $p < 0,01$ и $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

ОПЖ новорожденных поросят в количестве $7-9 \times 10^6$ островков/кг трансплантировали в костный мозг на 21 сутки после введения кроликам диабетогенной дозы аллоксана. Из литературных данных известно, что концентрация $5-6 \times 10^5$ островков/кг является достаточной при трансплантации для компенсации углеводного обмена у животных с экспериментальным диабетом (Korbitt et al., 1996; Triverdi et al., 2001). Следует отметить, что введение аллоксана приводит к массовой гибели β -клеток поджелудочной железы. Аллоксан и его восстановленный продукт диалуровая кислота вступают в редокс-цикл, что приводит к активации перекисного окисления липидов, накоплению в клетках свободных радикалов, а также к снижению функционирования антиоксидантной системы в организме. Действие активных соединений кислорода с одновременным увеличением внутриклеточной

концентрации кальция приводит к быстрой гибели β -клетки поджелудочной железы путем некроза или активации апоптоза (Єльський та ін., 2007). В результате этого на 21 сутки после введения аллоксана у животных развивалась стойкая гипергликемия.

После ксенотрансплантации ОПЖ в костный мозг наблюдалось постепенное снижение уровня глюкозы в крови у кроликов с экспериментальным диабетом 1 типа до значений интактной группы. На седьмые сутки после трансплантации ОПЖ новорожденных поросят уровень глюкозы в среднем составлял $7,93 \pm 0,56$ ммоль/л, оставаясь на протяжении 60 дней на таком уровне (рис. 1). В интактной группе животных уровень глюкозы в среднем составлял $6,05 \pm 0,18$ ммоль/л.

На 60 сутки после трансплантации ОПЖ новорожденных поросят в костный мозг животных-реципиентов содержание глюкозы в крови увеличивалось и на 91 сутки посттрансплантационного периода составляло $12,425 \pm 0,075$ ммоль/л ($p < 0,01$ по сравнению с интактными животными).

Следует отметить, что у интактной группы животных, которым вместо ОПЖ в костный мозг вводили тот же объем питательной среды 199 с антибиотиками, уровень глюкозы не изменялся на протяжении всего периода исследования и в среднем составлял $5,93 \pm 0,14$ ммоль/л (рис. 1).

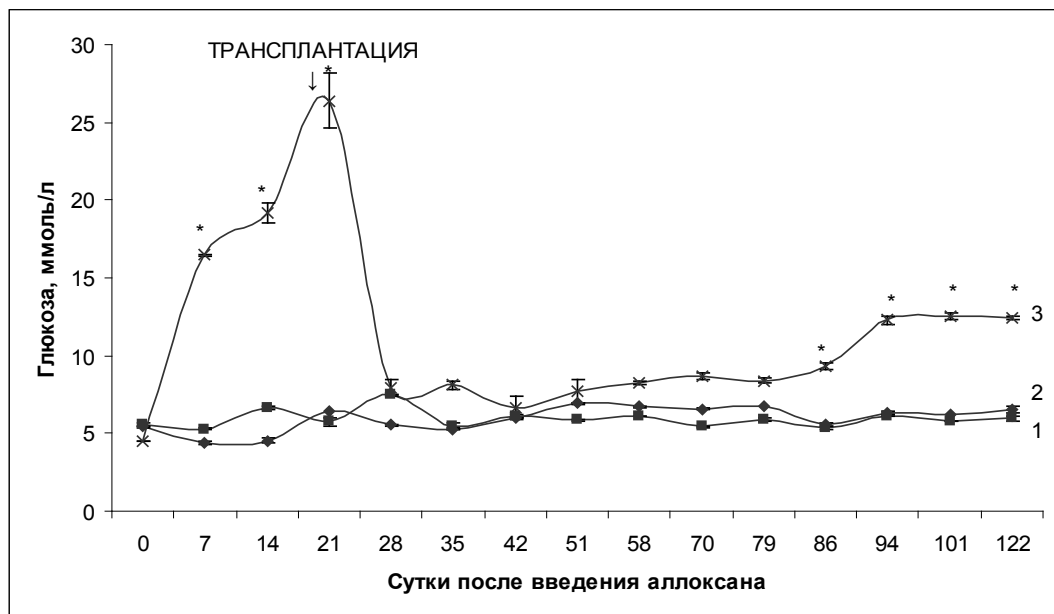


Рис. 1. Динамика гликемии у интактных животных (1), интактных животных до и после введения в костный мозг питательной среды (2) и животных с экспериментальным СД 1 типа до и после трансплантации ОПЖ новорожденных поросят в костный мозг (3)

*Примечание: * – $p < 0,01$ по сравнению с интактными животными.*

При введении животным с экспериментальным СД 1 типа питательной среды 199 в костный мозг уровень глюкозы сохранялся на достаточно высоком уровне и в среднем составлял $25,175 \pm 0,282$ ммоль/л ($p < 0,01$ по сравнению с интактными животными) на протяжении всего периода наблюдения. Кроме гипергликемии, у этой группы животных было отмечено наличие других клинических признаков СД 1 типа: полифагия, полидипсия, полиурия, выпадение волосяного покрова, потеря массы тела.

Одним из методов выявления нарушений углеводного обмена и способов функциональной оценки ОПЖ в посттрансплантационный период является проведение теста на толерантность к глюкозе. При проведении теста интактным животным была получена классическая гликемическая кривая с пиком на 30 минуте после введения глюкозы и снижением до близкого к исходному уровню к 90 минуте исследования. Достоверных отличий относительно интактной группы не было обнаружено при проведении теста на толерантность к глюкозе на 90 сутки в интактной группе животных с «ложным» трансплантатом (рис. 2).

Гликемическая кривая у животных на 90 сутки после ксенотрансплантации ОПЖ в костный мозг изменялась подобно контрольной группе, и на протяжении 90 минут уровень глюкозы в крови возвращался к исходным значениям (рис. 2), что свидетельствовало о распределении глюкозы в организме животных-реципиентов за счет функционирования ксенотрансплантата. Однако следует отметить, что на момент проведения теста на толерантность к глюкозе уровень глюкозы был увеличен у животных с ксеногенным трансплантатом ($p < 0,05$ по сравнению с интактными животными).

Для группы животных с экспериментальным СД 1 типа, которым в костный мозг вместо ксенотрансплантата вводили среду 199, тест углеводной нагрузки не проводили, так как исходный уровень глюкозы в крови к моменту исследования в пять раз превышал нормальные значения.

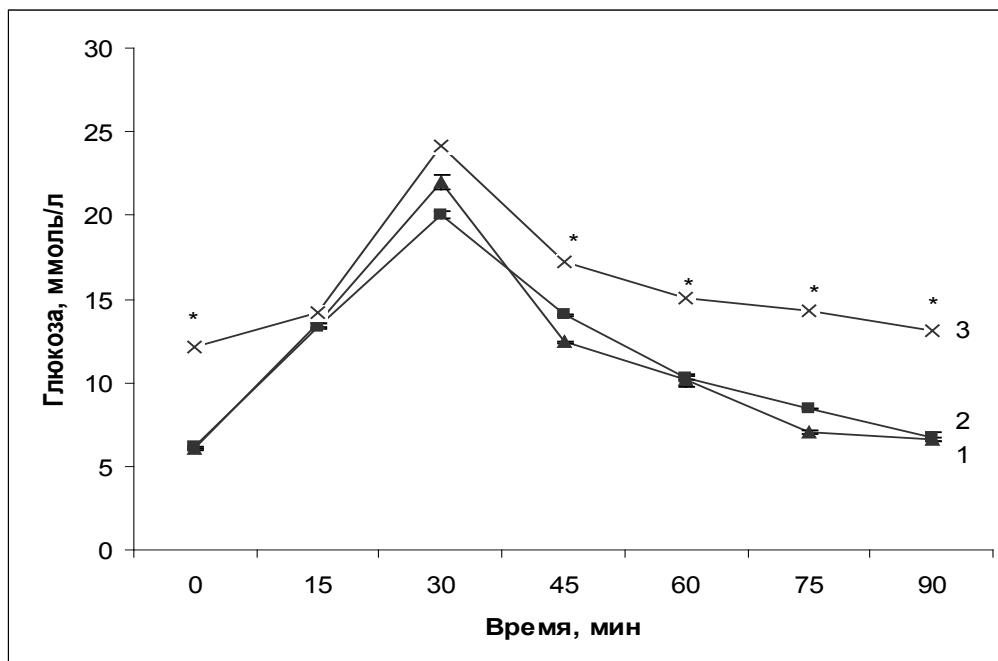


Рис. 2. Гликемические кривые при однократной нагрузке глюкозой у интактных животных (1), у интактных животных на 90 сутки после введения в костный мозг среды 199 (2) и животных с экспериментальным СД 1 типа на 90 сутки после ксенотрансплантации в костный мозг ОПЖ (3)

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными.

Важным показателем присутствия СД 1 типа в организме является наличие гликозурии, которая обусловлена снижением реабсорбции глюкозы в почечных канальцах из-за накопления в их эпителии гликогена. Также известно, что длительная гипергликемия приводит к развитию гломерулосклероза и нарушению почечной фильтрации глюкозы (Дедов и др., 2001; Комісаренко та ін., 2003; Fioretto et al., 2006). На седьмые сутки после ксенотрансплантации ОПЖ в костный мозг у животных наблюдалось снижение суточной глюкозы в моче, а на 14 сутки посттрансплантационного периода глюкоза в моче не обнаруживалась. Однако с 60 суток посттрансплантационного периода отмечалось появление глюкозы в моче (табл. 1). В интактной и контрольной после введения в костный мозг среды 199 группах животных глюкоза в моче не была обнаружена на протяжении всего исследования. В группе животных с экспериментальным диабетом концентрация глюкозы в моче была высокой и не снижалась на протяжении 91 суток (табл. 1), что свидетельствовало о развитии нефропатии при СД 1 типа.

На сегодняшний день при диагностике и лечении СД 1 типа большое внимание уделяется оценке содержания гликозилированного гемоглобина HbA_{1c} в крови, так как этот показатель способен выявить степень компенсации углеводного обмена на протяжении длительного периода времени (три месяца). При изучении этого показателя на 90 сутки у животных после ксенотрансплантации ОПЖ в костный мозг было отмечено его повышение ($p < 0,05$ по сравнению с интактными животными). Достоверных отличий в содержании гликозилированного гемоглобина относительно интактной группы не было обнаружено у контрольной группы животных на 90 сутки после введения в костный мозг среды 199, в то время как у группы животных с экспериментальным диабетом этот показатель значительно превышал значения интактной группы ($p < 0,05$ по сравнению с интактными животными). Следует отметить, что на 90 сутки посттрансплантационного периода у животных с экспериментальным диабетом 1 типа, которым в костный мозг вводили среду 199, уровень гликозилированного гемоглобина был в 4,5 раза выше относительно группы животных с ксеногенным трансплантатом ОПЖ (табл. 1).

Следовательно, питательная среда 199 без ксенотрансплантата, введенная в костный мозг, не оказывала влияния на уровень гликемии и другие показатели углеводного обмена, а также общее

состояние животных-реципиентов, тогда как трансплантация ОПЖ новорожденных поросят в костный мозг способствовала стабилизации углеводного обмена и исчезновению клинических проявлений СД 1 типа.

Таблица 1.

Содержание глюкозы в моче и гликозилированного гемоглобина в крови у экспериментальных животных

Условия эксперимента	Глюкоза, %							HbA _{1c} , мкмоль фруктоза/г Hb
	До трансплантации	7 сут.	14 сут.	21 сут.	60 сут.	77 сут.	91 сут.	
Интakтные животные (n=5)	0	0	0	0	0	0	0	1,55 ± 0,02
Интakтные животные, которым в костный мозг вводили среду 199 (n=5)	0	0	0	0	0	0	0	1,63 ± 0,01
Животные с экспериментальным СД 1 типа, которым в костный мозг вводили среду 199 (n=5)	2	2	2	2	2	2	2	18,1 ± 0,19*
Животные с экспериментальным СД 1 типа, которым трансплантировали в костный мозг ОПЖ новорожденных поросят (n=6)	2	0,1	0	0	0,1	0,1	0,5	4,47 ± 0,22*

*Примечание: * – p<0,05 по сравнению с интактными животными.*

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что ксенотрансплантация островков поджелудочной железы в костный мозг позволяет на протяжении двух месяцев поддерживать нормогликемию и другие показатели углеводного обмена в пределах нормы у кроликов с экспериментальным сахарным диабетом 1 типа, однако, на более поздних сроках посттрансплантационного периода действие ксенотрансплантата снижается.

Список литературы

- Анастасій Л.В., Малижєв В.О. Проблеми та шляхи їх подолання при ксенотрансплантації ендокринних органів // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 138–140.
- Дєдов И.И., Шєстопалова М.В., Милєнькая Т.М. Сахарный диабет: ретинопатия, нефропатия. – М.: Медицина, 2001. – 176с.
- Єльський В.М., Зінкович І.І., Сєлєзньова О.В. Вплив трансплантації клітинних культур на основні показники вуглеводного обміну при цукровому діабеті // Ендокринологія. – 2007. – Т.12, №2. – С. 276–286.
- Ковальська І.О. Цукровий діабет // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 140–142.
- Комісаренко І.В., Боднар П.М., Комісаренко Ю. І. та ін. Ендокринологія. – К.: «Здоров'я», 2003. – 512с.
- Третьяк С.И., Прохоров А.В., Глинник А.А. Отдаленные последствия ксенотрансплантации макроинкапсулированной культуры островковых клеток поджелудочной железы // Матеріали ІІІ з'їзду трансплантологів України. – 2004. – С. 364–366.
- Турчин І.С., Зубкова Г.А., Давидова Г.І. та ін. Проблеми ксенотрансплантації // Трансплантологія. – 2002. – Т.3, №2. – С. 137–145.
- Basta G., Racanicchi L., Mansueto F. et al. Neonatal pig pancreatic duct-derived insulin-producing cells: preliminary in vitro studies // Transplant Proc. – 2004. – Vol.36. – P.609.
- Delis S., Burke G.W., Ciancio G. Bone marrow-induced tolerance in the era of pancreas and islet transplantation // Pancreas. – 2006. – Vol.32, №1. – P. 1–8.

- Fioretto P., Bruseghin M., Berto I. et al. Renal protection in diabetes: Role of glycemic control // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – Vol.17, №4. – P. 86–89.
- Horton P.J., Hawthorne W.J., Walters S.N. et al. Induction of allogeneic islet tolerance in a large-animal model // Proc. Transplant. – 2000. – Vol.9, №6. – P. 877–887.
- King A., Andersson A., Berit L.S. et al. The role of capsule composition and biologic responses in the function of transplanted microencapsulated islets of Langerhans // Transplantation. – 2003. – Vol.76, №2. – P. 275–279.
- Korbutt G.S., Elliot J.F., Zilianc A.O. et al. Large-scale isolation, growth and function of neonatal islet cells // Clin. Invest. – 1996. – №97. – P.2119.
- Qixin S., Wang D., Gregg A.H. et al. Long-term islet graft survival in NOD mice by abrogation of recurrent autoimmunity // Diabetes. – 2004. – Vol.53. – P. 2338–2345.
- Ryan E.A., Lakey J.R., Paty B.W. et al. Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control // Diabetes. – 2002. – Vol.51. – P. 2148–2157.
- Salazar-Banuelos A., Wright J., Sigale D., Benitez-Briebesca L. The bone marrow as a potential receptor site for pancreatic islet grafts // Arch. Med. Res. – 2008. – Vol.39, №1. – P. 139–141.
- Sato T., Inagaki A., Uchida K. et al. Diabetes mellitus after transplant: relationship to pretransplant glucose metabolism and tacrolimus or cyclosporine A-based therapy // Transplantation. – 2003. – Vol.76, №9. – P. 1320–1326.
- Simpson E.A. A historical perspective on immunological privilege // Immunol. Rev. – 2006. – Vol.213. – P. 12–22.
- Triverdi N., Hollister-Lock J., Lopez-Avalos M.D. et al. Increase in β -cell mass in transplanted porcine cell clusters is due to proliferation of β -cells and differentiation of duct cells // Endocrinology. – 2001. – Vol.142, №5. – P. 2115–2122.
- Valdes-Gonzalez R.A., Silva-Torres M.L., Ramirez-Gonzalez B. et al. Improved method for isolation of porcine neonatal pancreatic cell clusters // Xenotransplantation. – 2005. – Vol.12. – P. 240–244.
- Vizzardelli C., Molano R.D., Pillegly A. et al. Neonatal porcine pancreatic cell clusters as a potential source for transplantation in humans characterization of proliferation, apoptosis, xenoantigen expression and gene delivery with recombinant AAV // Xenotransplantation. – 2002. – Vol.9. – P. 14–24.

Трансплантація острівців підшлункової залози новонароджених поросят у кістковий мозок кролів з експериментальним цукровим діабетом 1 типу
Н.В.Колот, Г.А.Божок, Є.І.Легач, Т.П.Бондаренко

Досліджували показники вуглеводного обміну після ксенотрансплантації острівців підшлункової залози в кістковий мозок кролів з експериментальним цукровим діабетом 1 типу. Трансплантація в кістковий мозок панкреатичних острівців новонароджених поросят протягом 60 діб дозволяє підтримувати нормоглікемію та регулювати вуглеводний обмін в організмі тварин-реципієнтів.

Ключові слова: *острівці підшлункової залози, трансплантація, вуглеводний обмін, цукровий діабет 1 типу.*

Transplantation of pancreatic islets of neonatal porcine to the bone marrow of rabbits with experimental diabetes mellitus 1 type
N.V.Kolot, G.A.Bozhok, E.I.Legach, T.P.Bondarenko

The authors have studied parameters of glucose balance after xenotransplantation of islets to the bone marrow of rabbits with experimental diabetes mellitus 1 type. Transplantation of neonatal porcine pancreatic islets to the bone marrow provides normoglycemia and regularity of glucose balance in animals-recipients during 60 days.

Key words: *pancreatic islets, transplantation, glucose balance, diabetes mellitus 1 type.*

Представлено: А.М.Компанієць
Рекомендовано до друку: В.В.Мартиненко